

## **Enzymy drogi zapasowej (ratunkowej) komórki jako cel terapii przeciw *Helicobacter pylori***

### **Opiekunowie:**

Prof. dr hab. Maria Agnieszka Bzowska, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski, biofizyk, specjalista w zakresie dyfrakcyjnych badań struktury białek i właściwości enzymów w roztworze [np. 1-3]; abzowska@biogeo.uw.edu.pl

Prof. dr hab. Katarzyna Jagusztyn-Krynicka, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, mikrobiolog, specjalista w dziedzinie *Helicobacter pylori* [np. 4-6]; kjkryn@biol.uw.edu.pl, e.k.jagusztyn-krynicka@uw.edu.pl

### **Obiekty badań**

- Dwa kluczowe enzymy drogi zapasowej (ratunkowej) komórki: fosforylaza nukleozydów purynowych (PNP) i syntetaza adenylobursztynianowa (AdSS) z bakterii *Helicobacter pylori*
- Hodowle bakteryjne *Helicobacter pylori* kilku szczepów – szczepy o zsekwencjonowanych genomach, izolowane od pacjentów (26695, J99, N6)

### **Metody badawcze**

- Metody inżynierii genetycznej (klonowanie genów w układach ekspresyjnych, oczyszczanie rekombinowanych białek metodami chromatograficznymi)
- Biochemiczna charakterystyka aktywności enzymów (testy specyficzności substratowej, wyznaczenie parametrów kinetycznych, testy podatności na inhibicję przez znane inhibitory enzymów z innych źródeł, wyznaczenie stałych inhibicji)
- Dyfrakcji rentgenowskiej na kryształach w celu rozwiązania struktury przestrzennej enzymów z atomową rozdzielczością
- Biofizyczne metody wyznaczania parametrów charakteryzujących strukturę oligomeryczną białek w roztworze (analityczne ultrawiwowanie) oraz charakteryzujących oddziaływanie białko-ligand (inhibitor) w roztworze, m.in. miareczkowania fluorescencyjne, izotermiczna kalorymetria miareczkująca (ITC), termoforeza (MST)
- Badania wzrostu i *H. pylori* w hodowlach płynnych w obecności inhibitorów enzymów PNP i AdSS, z wykorzystaniem licznika mikroplętek

### **Cele badań**

- Określenie molekularnego mechanizmu działania wymienionych wyżej dwóch kluczowych enzymów drogi zapasowej (ratunkowej) komórki: PNP i AdSS *H. pylori*
- Scharakteryzowanie dynamiki hamowania przez znane inhibitory badanych enzymów namnażania się kilku szczepów *H. pylori*, izolowanych od pacjentów.
- W oparciu o uzyskane wyniki zaprojektowanie silnych, specyficznych inhibitorów PNP i AdSS z *H. pylori*.

### **Opis problemu badawczego, jego znaczenia i ogólny plan badań**

Celem naukowym projektu jest eksperymentalna weryfikacja na poziomie komórkowym i molekularnym założeń nowatorskiego podejścia do terapii przeciw mikroorganizmom chorobotwórczym pozbawionym możliwości syntezy puryn i nukleozydów purynowych *de novo*, jak np. *H. pylori* [7,8]. Rozwój takich mikroorganizmów uzależniony jest całkowicie od drogi metabolicznej zwanej drogą zapasową (ratunkową) komórki (ang. *salvage pathway*), jako jedynej umożliwiającej pozyskiwanie budulca do syntezy DNA i RNA. Zatem blokowanie tego szlaku powinno zahamować ich namnażanie. W ramach projektu planuje się zbadanie dwóch enzymów tego szlaku, fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) i syntetazy adenylobursztynianowej (AdSS) *H. pylori* i sprawdzenie czy hamowanie każdego z nich osobno lub obu równocześnie wystarczy do zablokowania rozwoju bakterii (z mocnym wskazaniem na drugie rozwiązanie czyli synergję wynikającą z hamowania równocześnie obu enzymów). Gdyby odpowiedź okazała się pozytywna, podejście takie otworzy potencjalne możliwości opracowania nowych skutecznych terapii przeciw mikroorganizmom pozbawionym możliwości syntezy puryn i nukleozydów purynowych *de novo*.

Bakteria *H. pylori* odkryta 30 lat temu [9], kolonizująca błonę śluzową żołądka, jest niebezpiecznym patogenem i przyczyną poważnych problemów zdrowotnym na całym świecie [10]. Szacuje się, że ponad połowa ludzkości jest zakażonych tą bakterią, a w niektórych krajach i niektórych grupach wiekowych odsetek zakażonych dochodzi nawet do 80% [11,12]. Należy jednak wspomnieć, że w ostatnim dziesięcioleciu odsetek osób zakażonych *H. pylori* w krajach rozwiniętych uległ znacznemu obniżeniu. Infekcja *H. pylori* jest czynnikiem ryzyka rozwoju wielu chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego, m.in. zapalenia błony śluzowej żołądka i dwunastnicy, choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, raka żołądka i chłoniaka typu MALT [13], choć na szczęście tylko u około 10–20% zakażonych rozwijają się choroby związane z tą infekcją, w tym u 1% nowotwory.

Jak dotąd nie jest dostępna, ani terapeutyczna, ani profilaktyczna, szczepionka przeciw *H. pylori*, a dotychczas stosowane różnorodne terapie jak np. potrójna czy sekwencyjna (oparte na zastosowaniu inhibitora pompy protonowej i przynajmniej dwóch antybiotyków) nie zawsze są skuteczne z powodu braku podatności na kurację niektórych pacjentów i oporności na antybiotyki wielu szczepów bakterii [14]. Zatem bardzo potrzebne są nowe metody terapeutyczne. Mamy pomysł na taką terapię, a proponowana praca doktorska jest elementem szerokiego projektu poświęconego badaniom podstawowym weryfikującym na poziomie molekularnym czy pomysł ten ma szansę na późniejszą praktyczną realizację.

Hamowanie jednego tylko enzymu drogi zapasowej może nie być wystarczające, bowiem zgodnie z opisaną niedawno maszyną enzymatyczną tego szlaku w *H. pylori*, dla kluczowych reakcji enzymatycznych istnieją połączenia alternatywne [15]. Zakładamy, że w przypadku *H. pylori*, konieczne będzie zatem równoczesne blokowanie dwóch enzymów tego szlaku: fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) i syntetazy adenylbursztynianowej (AdSS). Według [15] enzymy te pełnią kluczową rolę w przeżywalności komórek *H. pylori*.

Ogólny plan badań w prezentowanym projekcie zakłada:

- uzyskanie rekombinowanych enzymów z *H. pylori*: fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) i syntetazy adenylbursztynianowej (AdSS),
- poznanie na poziomie molekularnym ich właściwości, w szczególności struktury przestrzennej i parametrów charakteryzujących oddziaływanie z ligandami,
- sprawdzenie, czy i w jakim stopniu można zahamować te enzymy przy użyciu znanych inhibitorów PNP i AdSS innych organizmów (np. z *E. coli*) oraz związków z bogatej kolekcji partnera zagranicznego (grupa Prof. Marii Luić i współpracujące z nią grupy chemików organicznych z Instytutu im. Rudjera Boškovića w Zagrzebiu w Chorwacji),
- sprawdzenie czy i w jakim stopniu stosując powyższe inhibitory można hamować rozwój *H. pylori* w hodowlach płynnych ,
- zaprojektowanie na podstawie struktury przestrzennej i właściwości obu białek, silniejszych i bardziej specyficznych inhibitorów

Proponowany temat pracy doktorskiej jest elementem polsko-chorwackiego projektu „Purine salvage pathway enzymes from *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*”, który realizują, od ponad roku, wspólnie, grupy Prof. Marii Luić z Instytutu im. Rudjera Boškovića w Zagrzebiu w Chorwacji, a w Polsce grupa prof. Agnieszki Bzowskiej z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego we współpracy z grupą prof. Katarzyny Jagusztyn-Krynickiej z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Projekt rozwija się dynamicznie, zatem zadania doktoranta i szczegółowy cel Jego/Jej pracy doktorskiej zależą od momentu, w którym doktorant włączy się do badań.

Badania prowadzone w Polsce mają zagwarantowane finansowane dzięki przyznanemu właśnie przez NCN grantu Harmonia. Badania w Chorwacji finansuje czteroletni grant przyznany prof. Marii Luić przez Croatian Science Foundation jesienią 2014 roku. Niezbędna do realizacji projektu infrastruktura badawcza jest w całości dostępna w instytucjach partnerów.

## Literatura

1. A. Bzowska, G. Koellner, B. Wielgus-Kutrowska, A. Stroh, G. Raszewski, A. Holý, T. Steiner, J. Frank, Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase with two full trimers in the asymmetric unit: important implications for the mechanism of catalysis. *J. Mol. Biol.* 342, 1015-1032 (2004)
2. G. Mikleušević, Z. Štefanić, M. Narczyk, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić. Validation of the catalytic mechanism of *E. coli* purine nucleoside phosphorylase by structural and kinetic studies. *Biochimie* 93, 1610-1622 (2011)
3. B. Wielgus-Kutrowska, K. Breer, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, A. a Dyzma, M. Narczyk, A. Girstun, K. Staroń, A. Bzowska, Trimeric purine nucleoside phosphorylase: exploring postulated one-third-of-the-sites binding in the transition-state. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 6758-6769, (2012)
4. P. Roszczenko, M. Grzeszczuk, P. Kobierecka, E. Wywiał, E. Nowak, P. Urbanowicz, P. Wincek, E. K. Jagusztyn-Krynicka. *Helicobacter pylori* HP0377, a member of the Dsb family, is an untypical multifunctional CcmG that cooperates with dimeric thioldisulfide oxidase HP0231. *BMC Microbiol.* 15, 135 (2015)
5. K. M. Bocian-Ostrzycka, A.M. Łasica, S. Dunin-Horkawicz, M. Grzeszczuk, K. Drabik, A. M. Dobosz, R. Godlewska, E. Nowak, J.-F. Collet, E. K. Jagusztyn-Krynicka. Functional and evolutionary analyses of *Helicobacter pylori* HP0231 (DsbK) protein with strong oxidative and chaperone activity characterized by a highly diverged dimerization domain. *Frontiers Microbiol.* 6, 1065 (2015.)
6. K. M. Bocian-Ostrzycka M. Grzeszczuk, L. Dziewit, E. K. Jagusztyn-Krynicka. Diversity of the Epsilonproteobacteria Dsb (disulfide bond) systems. *Frontiers in Microbiology* 6, 570 (2015)
7. J.E. Hyde, Targeting purine and pyrimidine metabolism in human apicomplexan parasites. *Curr. Drug. Targets.* 8, 31–47 (2007)
8. S. Tan, L.S. Tompkins, M.R. Amieva, *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PloS Pathog.* 5, e1000407 (2009)
9. B.J. Marshall, J.R. Warren. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1 (8390), 1311-1315 (1984)
10. D. Makola, D.A. Peura, S.E. Crowe, *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J. Clin. Gastroenterol.* 41, 548–558 (2007)
11. K. Dzierżanowska-Fangrat, E. Rożynek, D. Celińska-Cedro et al., Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicenter study. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 230–234 (2005).
12. M. Katičić, Peptic Ulcer Disease. *Medicus.* 15, 39–52, (2006)
13. M.F. Go, Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 10, 3–15, (2002)
14. P. Ruggiero, *Helicobacter pylori* infection: what's new. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 337-344 (2012)
15. G. Liechti, J.B. Goldberg, *Helicobacter pylori* relies primarily on the purine salvage pathway for purine nucleotide biosynthesis *J. Bacteriol.* 194, 839–854, (2012).